

①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3727411 A1**

②① Aktenzeichen: P 37 27 411.2
②② Anmeldetag: 17. 8. 87
②③ Offenlegungstag: 24. 3. 88

⑤① Int. Cl. 4:
C12N 1/20
C 12 P 41/00
C 12 P 17/10
C 12 N 9/18
C 07 D 209/42
// (C12N 9/18,
C12R 1:38)
(C12P 17/10,
C12R 1:38)
(C12P 41/00,
C12R 1:38)

DE 3727411 A1

③① Unionspriorität: ③② ③③ ③①
19.08.86 CH 3322/86

⑦① Anmelder:
Ciba-Geigy AG, Basel, CH

⑦④ Vertreter:
Zumstein, F., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Klingseisen, F.,
Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000 München

⑦② Erfinder:
Ghisalba, Oreste, Dr., Reinach, CH; Ramos, Gerardo,
Dr., Arlesheim, CH; Schär, Hans-Peter, Dr., Aesch,
CH

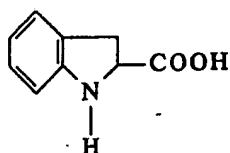
⑤④ Verfahren zur Herstellung von 2-Indolincarbonsäure

Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Herstellung von optisch aktiver 2-Indolincarbonsäure, das einen mikrobiell bzw. enzymatisch katalysierten Schritt aufweist, sowie die neuen Mikroorganismen bzw. Enzyme, die dieses Verfahren katalysieren. Es beruht darauf, daß bestimmte Mikroorganismen oder aus ihnen isolierte Enzyme vom Racemat eines N-geschützten 2-Indolincarbonsäureesters selektiv ein Enantiomer zur N-geschützten 2-Indolincarbonsäure hydrolysieren, während das andere Enantiomer nicht verseift wird.

DE 3727411 A1

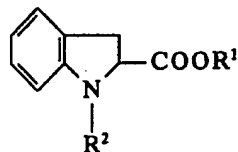
Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von 2R oder 2S-Indolincarbonsäure der Formel I,



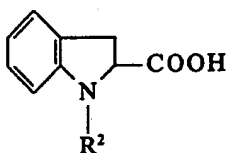
(I)

dadurch gekennzeichnet, daß man eine 2RS-Verbindung der Formel III,



(III)

worin R¹ für unsubstituiertes oder substituiertes Alkyl, Cycloalkyl oder unsubstituiertes oder substituiertes Aryl steht und R² eine Aminoschutzgruppe bedeutet, durch mikrobielle oder enzymatische Katalyse zu einem Gemisch umsetzt, das entweder aus der 2R-Verbindung der Formel II



(II)

und der 2S-Verbindung der Formel III oder aus der 2S-Verbindung der Formel II und der 2R-Verbindung der Formel III besteht, und die Verbindung der Formel II oder III, die die gewünschte Konfiguration am C-2-Atom des Indolingerüsts aufweist, isoliert und ihre geschützte Aminogruppe sowie gegebenenfalls die veresterte Gruppe COOR¹ racemisierungsfrei freisetzt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin R¹ für unsubstituiertes oder substituiertes Niederalkyl, Cycloalkyl oder unsubstituiertes oder substituiertes Phenyl steht und R² einen Acylrest bedeutet.

3. Verfahren nach Anspruch 1, worin R¹ für Niederalkyl, Arylniederalkyl, Halogenniederalkyl, Hydroxyniederalkyl, Niederalcoxyniederalkyl oder Hydroxy/Niederalcoxyniederalkyl steht und R² einen Niederalkanoylrest bedeutet.

4. Verfahren nach Anspruch 1, worin R¹ für Niederalkyl steht und R² Niederalkanoyl bedeutet.

5. Verfahren nach Anspruch 1, worin R¹ für Methyl steht und R² Acetyl bedeutet.

6. Verfahren nach Anspruch 1, worin die mikrobielle Katalyse durch Verwendung von Mikroorganismen des Genus *Pseudomonas*, eines *Pseudomonas*-ähnlichen Genus, des Genus *Hyphomicrobium* oder von Mischkulturen davon, die eine Aminosäure-spaltende Esterase produzieren, erzielt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, worin die mikrobielle Katalyse durch Verwendung von Mikroorganismen, die auf RS-Verbindungen der Formel III unter Produktion von enantioselektiver Esterase Wachs-

tum zeigen, erzielt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 6, worin die mikrobielle Katalyse durch Verwendung von Mikroorganismen aus der Gruppe folgender Stämme: DMF 3/3 (NRRL-B-15 358), DMF 3/4 (NRRL-B-15 359), DMF 3/5 (NRRL-B-15 360), DMF 3/6 (NRRL-B-15 361), DMF 3/11 (NRRL-B-15 362), DMF 3/12 (NRRL-B-15 363), DMF 4/4 (NRRL-B-15 364), DMF 5/3 (NRRL-B-15 365), DMF 5/5 (NRRL-B-15 366), DMF 5/7 (NRRL-B-15 367), DMF 5/8 (NRRL-B-15 368), DMF 5/9 (NRRL-B-15 369), DMF 5/10 (NRRL-B-15 370), Mischkulturen dieser Stämme sowie der Mischkultur EE 210 (DSM-3476) erzielt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 6, worin die mikrobielle Katalyse durch Verwendung der Stämme DMF 3/3, DMF 5/8 oder der Mischkultur EE-210 erzielt wird.

10. Verfahren nach Anspruch 1, worin die enzymatische Katalyse durch Verwendung einer oder mehrerer Esterasen erzielt wird, die sich aus einem der in Anspruch 6 bis 9 genannten Mikroorganismen isolieren lassen.

11. Verfahren nach Anspruch 10, worin die enzymatische Katalyse durch Verwendung der aus dem Mikroorganismus DMF 5/8 isolierten Esterase erzielt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 10, worin die enzymatische Katalyse durch Verwendung der aus der Mischkultur EE-210 isolierten Esterase erzielt wird.

13. Verfahren nach Anspruch 1, worin die erhaltene Verbindung der Formel II die gewünschte Konfiguration aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß die geschützte Aminogruppe dieser Verbindung racemisierungsfrei freigesetzt wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung der Formel III mit der nicht gewünschten Stereochemie gezielt racemisiert und erneut in das Verfahren nach Anspruch 1 eingebracht wird.

15. Verfahren nach Anspruch 1, worin die erhaltene Verbindung der Formel III die gewünschte Konfiguration aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß die geschützte Aminogruppe sowie die Estergruppe dieser Verbindung racemisierungsfrei freigesetzt werden.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung der Formel II mit der nicht gewünschten Stereochemie verestert, gezielt racemisiert und erneut in das Verfahren nach Anspruch 1 eingebracht wird.

17. Die synthetische Mischkultur EE-210.

18. Verwendung von Mikroorganismen aus der Gruppe folgender Stämme: DMF 3/3 (NRRL-B-15 358), DMF 3/4 (NRRL-B-15 359), DMF 3/5 (NRRL-B-15 360), DMF 3/6 (NRRL-B-15 361), DMF 3/11 (NRRL-B-15 362), DMF 3/12 (NRRL-B-15 363), DMF 4/4 (NRRL-B-15 364), DMF 5/3 (NRRL-B-15 365), DMF 5/5 (NRRL-B-15 366), DMF 5/7 (NRRL-B-15 367), DMF 5/8 (NRRL-B-15 368), DMF 5/9 (NRRL-B-15 369), DMF 5/10 (NRRL-B-15 370), Mischkulturen dieser Stämme sowie der Mischkultur EE 210 (DSM-3476) in dem Verfahren nach Anspruch 1

19. Verwendung der Stämme DMF 3/3, DMF 5/8 oder der Mischkultur EE-210 in dem Verfahren nach Anspruch 1.

20. Die aus Mikroorganismen aus der Gruppe fol-

gender Stämme: DMF 3/3 (NRRL-B-15 358), DMF 3/4 (NRRL-B-15 359), DMF 3/5 (NRRL-B-15 360), DMF 3/6 (NRRL-B-15 361), DMF 3/11 (NRRL-B-15 362), DMF 3/12 (NRRL-B-15 363), DMF 4/4 (NRRL-B-15 364), DMF 5/3 (NRRL-B-15 365), DMF 5/5 (NRRL-B-15 366), DMF 5/7 (NRRL-B-15 367), DMF 5/8 (NRRL-B-15 368), DMF 5/9 (NRRL-B-15 369), DMF 5/10 (NRRL-B-15 370), Mischkulturen dieser Stämme sowie der Mischkultur EE 210 (DSM-3476) erhältlichen Esterasen, die das Verfahren nach Anspruch 1 katalysieren.

21. Die aus dem Mikroorganismus DMF 5/8 erhältliche Esterase.

22. Die aus dem Mikroorganismus DMF 5/8 erhältliche Esterase zur Verwendung in den Verfahren nach Anspruch 1.

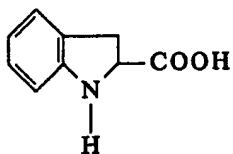
23. Die aus der Mischkultur EE-210 erhältliche Esterase.

24. Die aus der Mischkultur EE-210 erhältliche Esterase zur Verwendung in dem Verfahren nach Anspruch 1.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Herstellung von optisch aktiver 2-Indolincarbonensäure, das einem mikrobiell bzw. enzymatisch katalysierten Schritt aufweist, sowie die neuen Mikroorganismen bzw. Enzyme, die dieses Verfahren katalysieren.

2-Indolincarbonensäure hat die in Formel I wiedergegebene Konstitution:



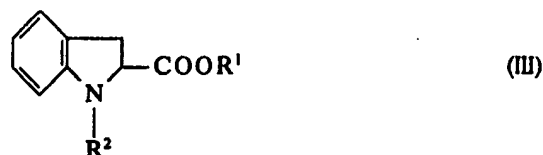
Dieser chirale Heterocyclus ist ein wichtiger Synthesebaustein für die Herstellung einiger pharmakologisch wertvoller Verbindungen, wie beispielsweise der 1-(4-Ethoxycarbonyl-2R,4R-dimethylbutanoyl)-2S-indolincarbonensäure, siehe z. B. Europäische Patentanmeldung 00 50 850. Dort wird unter Verwendung von Verbindungen der Formel I die Herstellung von ACE-Hemmern beschrieben. Vorteilhafterweise wird die 2-Indolincarbonensäure dabei enantiomerenrein eingesetzt. Zur Bereitstellung enantiomerenreiner 2S- oder 2R-Indolincarbonensäure ist bisher nur die Technik der Racematspaltung bekannt. So beschreiben J. L. Stanton et al., J. Med. Chem. 26, 1267 (1983), die Auftrennung von racemischer 1-Acetyl-2-indolincarbonensäure unter Zuhilfenahme von Cinchonidin. Das acetylierte reine Enantiomer kann dann racemisierungsfrei hydrolysiert werden. In ähnlicher Weise ist im US-Patent 45 20 205 die Trennung von racemischer 2,3-Dihydroindol-2-carbonsäure unter Verwendung von Ephedrin beschrieben.

Das Verfahren der vorliegenden Erfindung zeichnet sich gegenüber diesem Stand der Technik in vorteilhafter Weise z. B. dadurch aus, daß höhere chemische und optische Ausbeuten erzielt werden können, ferner wird die Verwendung teurer chiraler Reagentien vermieden.

Das Verfahren beruht darauf, daß bestimmte Mikroorganismen oder aus ihnen isolierte Enzyme vom Racemat eines N-geschützten 2-Indolincarbonensäureesters selektiv ein Enantiomer zur N-geschützten 2-Indolincarbonensäure hydrolysieren, während das andere Enan-

tiomer nicht verseift wird.

Im einzelnen besteht das erfindungsgemäße Verfahren unter anderem darin, daß man eine 2RS-Verbindung der Formel III,



worin R¹ für unsubstituiertes oder substituiertes Alkyl, Cycloalkyl oder unsubstituiertes oder substituiertes Aryl steht und R² eine Aminoschutzgruppe bedeutet, durch mikrobielle oder enzymatische Katalyse zu einem Gemisch umgesetzt, das entweder aus der 2R-Verbindung der Formel II



und der 2S-Verbindung der Formel III oder aus der 2S-Verbindung der Formel II und der 2R-Verbindung der Formel III besteht.

Diese Produktgemische lassen sich auf an sich bekannte Weise auftrennen und auf einem der beiden nachstehend beschriebenen Wege in die jeweils gewünschte 2R- oder 2S-Indolincarbonensäure überführen:

Weg A

(die erhaltene Verbindung der Formel II weist die Konfiguration auf, die für die 2-Indolincarbonensäure gewünscht wird)

Die geschützte Aminogruppe der Verbindung der Formel II wird racemisierungsfrei freigesetzt, z. B. nach J. L. Stanton et al., loc. cit., racemisierungsfrei hydrolysiert, man erhält unmittelbar die gewünschte Indolincarbonensäure. Die Verbindung der Formel III mit der nicht gewünschten Stereochemie wird gezielt racemisiert und kann einer erneuten erfindungsgemäßen Verseifung unterworfen werden. Die gezielte Racemisierung einer Verbindung der Formel III wird auf an sich bekannte Weise, z. B. durch Behandeln mit einem Anhydrid, wie einem Niederalcancarbonsäureanhydrid, z. B. Acetanhydrid, durchgeführt.

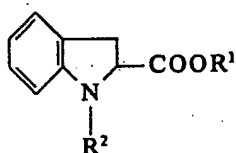
Weg B

(die erhaltene Verbindung der Formel III weist die Konfiguration auf, die für die 2-Indolincarbonensäure gewünscht wird)

Die geschützte Aminogruppe sowie die Estergruppe COOR¹ der Verbindung der Formel III werden racemisierungsfrei freigesetzt, z. B. hydrolysiert. Die Verbindung der Formel II mit der nicht gewünschten Stereochemie wird verestert, gezielt racemisiert und kann einer erneuten erfindungsgemäßen Verseifung unterworfen werden. Die Veresterung erfolgt auf an sich bekannte Weise, beispielsweise durch Umsetzung mit einem Diazoniederalcan, wie Diazometan, oder, vorzugsweise,

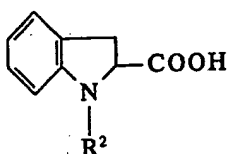
durch Überführen in ein reaktionsfähiges Derivat der Carboxylgruppe, z. B. in ein Carbonsäurehalogenid, wie das Carbonsäurechlorid, beispielsweise mit einem Chlorierungsmittel wie Thionylchlorid, und anschließende Reaktion beispielsweise mit einem Niederalkanol, wie Methanol. Die gezielte Racemisierung läßt sich wie unter Weg A angegeben durchführen.

Die Erfindung betrifft daher auch das Verfahren zur Herstellung von 2R- oder 1S-Indolincarbonensäure der Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß man eine 2RS-Verbindung der Formel III,



(III)

worin R¹ für unsubstituiertes oder substituiertes Alkyl, Cycloalkyl oder unsubstituiertes oder substituiertes Aryl steht und R² eine Aminoschutzgruppe bedeutet, durch mikrobielle oder enzymatische Katalyse zu einem Gemisch umsetzt, das entweder aus der 2R-Verbindung der Formel II



(II)

und der 2S-Verbindung der Formel III oder aus der 2S-Verbindung der Formel II und der 2R-Verbindung der Formel III besteht, und die Verbindung der Formel II oder III, die die gewünschte Konfiguration am C-2-Atom des Indolingerüsts aufweist, isoliert und ihre geschützte Aminogruppe sowie gegebenenfalls die veresterte Gruppe COOR¹ racemisierungsfrei freisetzt.

Eine vorteilhafte Reaktionsführung besteht darin, daß die zur racemisierungsfreien Aminogruppenfreisetzung, z. B. durch Hydrolyse, jeweils nicht verwendete Verbindung der Formel II oder III durch gezielte Racemisierung, der im Falle einer Verbindung der Formel II eine Veresterung vorausgeht, wieder in racemisches Ausgangsmaterial übergeführt wird. Das beschriebene Verfahren erweist sich somit wegen der Wiederverwendbarkeit des im ersten Reaktionslauf nicht brauchbaren Materials als neues Ausgangsmaterial als außerordentlich verlustarm.

Unsubstituiertes Alkyl R¹ kann bis und mit 20 Kohlenstoffatome enthalten und ist vorzugsweise Niederalkyl. Substituiertes Alkyl R¹ ist vorzugsweise durch Aryl, Halogen, Hydroxy und/oder Niederalkoxy substituiertes Niederalkyl und steht z. B. für Arylniederalkyl, Halogenniederalkyl, Hydroxyniederalkyl, Niederalcoxyniederalkyl oder Hydroxy/Niederalcoxyniederalkyl.

Aryl steht, auch in Definitionen wie Arylniederalkyl, für aromatische Kohlenwasserstoffreste, substituiertes Aryl für solche Reste, die durch Niederalkyl, Hydroxy, geschütztes Hydroxy, Niederalkoxy, Halogen, Amino, Halogenniederalkyl, Hydroxyniederalkyl, Aminoniederalkyl oder Nitro substituiert sind und bedeutet z. B. unsubstituiertes oder entsprechend substituiertes 1- oder 2-Naphthyl, vorzugsweise jedoch unsubstituiertes oder entsprechend substituiertes Phenyl, wie Phenyl, Methylphenyl, Hydroxyphenyl, Benzoyloxyphenyl, Methoxy-

phenyl, Hydroxymethylphenyl, Aminomethylphenyl oder Nitrophenyl.

Die vor- und nachstehend verwendeten Allgemeinbezeichnungen haben, sofern sie nicht abweichend definiert sind, die folgenden Bedeutungen:

Der Ausdruck "nieder" bedeutet, daß entsprechend definierte Gruppen oder Verbindungen bis 7, vorzugsweise bis 4 Kohlenstoffatome enthalten.

Niederalkyl ist z. B. Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, Isobutyl oder tert.-Butyl, ferner n-Pentyl, n-Hexyl oder n-Heptyl, bevorzugt Methyl.

Niederalkoxy steht in erster Linie für Methoxy, Ethoxy, n-Propoxy, Isopropoxy, n-Butoxy, Isobutoxy oder tert.-Butoxy.

Halogen hat vorzugsweise eine Atomnummer bis 35 und ist insbesondere Chlor, ferner Fluor oder Brom, kann jedoch auch Iod sein.

Geschütztes Hydroxy ist verestertes, z. B. als Acylderivat verestertes Hydroxy, wie Niederalkanoyloxy, Benzoyloxy, carbonyloxy oder Niederalcoxycarbonyloxy, oder verethertes Hydroxy, z. B. 2-Tetra-hydropyranyloxy oder Benzoyloxy.

Halogenniederalkyl ist z. B. Halogenmethyl, wie Trifluormethyl oder 1- oder 2-Chlorethyl.

Hydroxyniederalkyl ist z. B. Mono- oder Dihydroxyniederalkyl, trägt die Hydroxygruppe(n) beispielsweise insbesondere in höherer als der α -Stellung, und bedeutet z. B. Hydroxymethyl, 2-Hydroxyethyl, 3-Hydroxy- oder 2,3-Dihydroxy-propyl, 4-Hydroxy- oder 2,4-Dihydroxybutyl, 5-Hydroxy-, 2,5-Dihydroxy- oder 3,5-Dihydroxy-pentyl.

Niederalcoxyniederalkyl ist z. B. Mono- oder Diniederalcoxyniederalkyl, trägt die Niederalkoxygruppe(n) beispielsweise insbesondere in höherer als der α -Stellung und ist beispielsweise 2-Methoxy-, 2-Ethoxy-, 2-Propoxy- oder 2-Isopropoxy-ethyl, 3-Methoxy- oder 3-Ethoxy-propyl oder 3,3-Dimethoxy-, 3,3-Diethoxy-, 2,3-Dimethoxy- oder 2,3-Diethoxypropyl oder 4,4-Dimethoxy-butyl, ferner Methoxy-, Ethoxy-, Dimethoxy- oder Propoxy- oder Isopropoxymethyl.

Aminoniederalkyl ist z. B. Aminomethyl oder 1- oder 2-Aminoethyl.

Niederalkanoyloxy ist z. B. Acetoxy, Propionyloxy, Butyryloxy, ferner Formyloxy oder Pivaloyloxy.

Niederalcoxycarbonyloxy ist z. B. Methoxycarbonyloxy oder Ethoxycarbonyloxy.

Arylniederalkyl ist vorzugsweise Phenylniederalkyl, z. B. Benzyl oder 1- oder 2-Phenylethyl.

Cycloalkyl weist z. B. 3 bis 8 Kohlenstoffatome auf, insbesondere 4 bis 6 Kohlenstoffatome, und steht z. B. für Cyclopropyl, Cyclopentyl oder Cyclohexyl.

Eine geschützte Aminogruppe kann beispielsweise in Form einer leicht spaltbaren Acylamino-, Acylimino-, Silylaminogruppe oder als Enamino-, Nitro-, Nitroso- oder Azidogruppe vorliegen. Die Freisetzung der geschützten Aminogruppe geschieht auf literaturbekannte Weise.

In einer entsprechenden Acylaminogruppe ist Acyl beispielsweise der Acylrest einer organischen Säure mit z. B. bis zu 18 Kohlenstoffatomen, insbesondere einer gegebenenfalls, z. B. durch Halogen oder Phenyl, substituierten Alkancarbonsäure oder gegebenenfalls, z. B. durch Halogen, Niederalkoxy oder Nitro, substituierten Benzoesäure, oder eines Kohlensäurehalbesters. Solche Acylgruppen sind beispielsweise Niederalkanoyl, wie Formyl, Acetyl oder Propionyl, Halogenniederalkanoyl, wie 2-Halogenacetyl, insbesondere 2-Fluor-, 2-Brom-, 2-Iod-, 2,2,2-Trifluor- oder 2,2,2-Trichloracetyl, gegebe-

nenfalls substituiertes Benzoyl, z. B. Benzoyl, Halogenbenzoyl, wie 4-Chlorbenzoyl, Niederalkoxybenzoyl, wie 4-Methoxybenzoyl, oder Nitrobenzoyl, wie 4-Nitrobenzoyl. Insbesondere ist auch Niederalkenyloxycarbonyl, z. B. Allyloxycarbonyl, oder gegebenenfalls in 1- oder 2-Stellung substituiertes Niederalkoxybenzoyl geeignet, wie Niederalkoxybenzoyl, z. B. Methoxy- oder Ethoxycarbonyl, gegebenenfalls substituiertes Benzyloxycarbonyl, z. B. Benzyloxycarbonyl oder 4-Nitrobenzyloxycarbonyl, Aroylmethoxycarbonyl, worin die Aroylgruppe vorzugsweise gegebenenfalls, z. B. durch Halogen, wie Brom substituiertes Benzoyl darstellt, z. B. Phenacyloxycarbonyl, 2-Halogenniederalkoxybenzoyl, z. B. 2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl, 2-Chlorethoxycarbonyl, 2-Bromethoxycarbonyl oder 2-Iodethoxycarbonyl, oder 2-(tris-substituiertes Silyl)-ethoxycarbonyl, wie 2-Triniederalkyl-silylethoxycarbonyl, z. B. 2-Trimethylsilylethoxycarbonyl oder 2-(Di-n-butyl-methyl-silyl)-ethoxycarbonyl, oder 2-Triarylsilylethoxycarbonyl, wie 2-Triphenylsilylethoxycarbonyl.

Ferner kann Acyl den Acylrest einer Aminosäure oder eines Oligopeptides bedeuten, wie Alanyl, Glycyl, Phenylalanyl, Valyl oder gebräuchliche Kombinationen von bis zu sechs der z. B. natürlich vorkommenden Aminosäuren.

In einer Acyliminogruppe ist Acyl beispielsweise der Acylrest einer organischen Dicarbonsäure mit z. B. bis zu 12 Kohlenstoffatomen, insbesondere einer entsprechenden aromatischen Dicarbonsäure, wie Phthalsäure. Eine solche Gruppe ist in erster Linie Phthalimino.

Eine Silylaminogruppe ist in erster Linie eine organische Silylaminogruppe. In diesen enthält das Siliciumatom vorzugsweise Niederalkyl, z. B. Methyl, Ethyl, n-Butyl oder tert-Butyl, ferner Niederalkoxy, z. B. Methoxy, als Substituenten. Geeignete Silylgruppen sind in erster Linie Triniederalkylsilyl, insbesondere Trimethylsilyl oder Dimethyl-tert-butylsilyl.

Weitere geschützte Aminogruppen sind z. B. Enaminogruppen, die an der Doppelbindung in 2-Stellung einen elektronenziehenden Substituenten, beispielsweise eine Carbonylgruppe, enthalten. Schutzgruppen dieser Art sind beispielsweise 1-Acyl-niederalk-1-en-2-yl-reste, worin Acyl z. B. der entsprechende Rest einer Niederalkancarbonsäure, z. B. Essigsäure, einer gegebenenfalls, z. B. durch Niederalkyl, wie Methyl oder tert-Butyl, Niederalkoxy, wie Methoxy, Halogen, wie Chlor, und/oder Nitro substituierten Benzoesäure, oder insbesondere eines Kohlensäurehalbesters, wie eines Kohlensäure-niederalkylhalbesters, z. B. -methylhalbesters oder -ethylhalbesters, und Niederalk-1-en insbesondere 1-Propen bedeutet. Entsprechende Schutzgruppen sind in erster Linie 1-Niederalkanoyl-prop-1-en-2-yl, z. B. 1-Acetyl-prop-1-en-2-yl, oder 1-Niederalkoxybenzoyl-prop-1-en-2-yl, z. B. 1-Ethoxybenzoyl-prop-1-en-2-yl.

Als Aminoschutzgruppe bevorzugt ist Niederalkanoyl, wie Formyl, Acetyl oder Propionyl, darunter insbesondere Acetyl. Diese Reste lassen sich auf an sich bekannte Weise hydrolytisch abspalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird bevorzugt mit Verbindungen der Formel III durchgeführt, in denen R¹ für Niederalkyl und R² für Niederalkanoyl steht, insbesondere mit solchen Verbindungen und unter den Bedingungen, die in den Beispielen erwähnt sind.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird unter mikrobieller Katalyse die katalytische Verwendung von Mikroorganismen des Genus *Pseudomonas*, eines *Pseudomonas*-ähnlichen Genus, des Genus *Hyphomicrobium* oder von Mischkulturen davon verstanden, die eine

Aminosäureester spaltende Esterase produzieren.

Dabei handelt es sich insbesondere um Mikroorganismen, die auf RS-Verbindungen der Formel III unter Produktion von enantioselektiver Esterase Wachstum zeigen, wie z. B. Mikroorganismen aus der Gruppe folgender Stämme: DMF 3/3 (NRRL-B-15 358), DMF 3/4 (NRRL-B-15 359), DMF 3/5 (NRRL-B-15 360), DMF 3/6 (NRRL-B-15 361), DMF 3/11 (NRRL-B-15 362), DMF 3/12 (NRRL-B-15 363), DMF 4/4 (NRRL-B-15 364), DMF 5/3 (NRRL-B-15 365), DMF 5/5 (NRRL-B-15 366), DMF 5/7 (NRRL-B-15 367), DMF 5/8 (NRRL-B-15 368), DMF 5/9 (NRRL-B-15 369), DMF 5/10 (NRRL-B-15 370), Mischkulturen dieser Stämme sowie die Mischkultur EE 210 (DSM-3476). Bevorzugt sind dabei die Stämme DMF 3/3, DMF 5/8 und die Mischkultur EE-210.

Die genannten Stämme mit der internen Bezeichnung DMF ... sind aus der Europäischen Patentanmeldung 1 27 581 bekannt.

Die neue synthetische Mischkultur EE-210, die ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist, stammt aus dem Klärschlamm einer Abwasserreinigungsanlage der Ciba-Geigy AG Monthey (Schweiz) und ist bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen, Grisebachstraße 8, D-3400 Göttingen, am 26. Juni 1985 hinterlegt worden (Hinterlegungsnummer: DSM-3476).

Die Isolierung von EE-210 erfolgt analog zu der in der Europäischen Patentanmeldung 1 27 581 beschriebenen Weise, z. B. wie in den Beispielen beschrieben. Die syntrophe methylotherme Mischkultur (*Pseudomonas* und *Hyphomicrobium*) besteht aus 4 Komponenten: Stäbchen und Bakterien mit Hyphen.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird unter enzymatischer Katalyse die katalytische Verwendung von Esterasen verstanden, die sich aus einem der vorstehend beschriebenen Mikroorganismen isolieren lassen.

Die Isolierung dieser Enzyme geschieht auf an sich bekannte Weise, indem die Zellen der Mikroorganismen aufgeschlossen werden, z. B. durch Behandlung mit Ultraschall. Nach Abtrennen der unlöslichen Zellbestandteile, z. B. durch Zentrifugieren, wird die Enzymlösung durch klassische Enzymreinigungsverfahren, wie Ionenaustauscher-Chromatographie oder Gelfiltration weiter aufgetrennt, bis die gesuchte Aktivität in genügender Reinheit vorliegt.

Die wie vorstehend aus dem Mikroorganismus DMF 5/8 erhaltene Esterase ist wie folgt charakterisiert:

Molekulargewicht	
(Gelfiltration):	30 000 (± 5000)
Stabilität (T _{50%}):	45°C

Inhibitoren:	
EDTA (10 mM):	—
Iodacetat (1 mM):	—

Substrate:	
N-Acetyl-2-indolincarbonsäure-methylester:	+
N-Acetyl-2-indolincarbonsäure-ethylester:	+
2-Indolincarbonsäuremethylester:	—
2-Indolincarbonsäureethylester:	—

Aus der Mischkultur EE-210 läßt sich eine Esterase erhalten, deren Molekulargewicht ca. 13% geringer ist.

Die wie vorstehend erhältlichen Esterasen, die das erfindungsgemäße Verfahren katalysieren, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Das betrifft vor allem die aus DMF 5/8 und die aus EE-210 wie

in den Beispielen beschrieben isolierbaren Esterasen.

Von den beiden Wegen A und B, die im im erfindungsgemäßen Verfahren beschritten werden können, ist der Weg A bevorzugt, das heißt derjenige, bei dem die erhaltene freie Säure der Formel II die für die 2-Indolincarbonensäure gewünschte Konfiguration aufweist.

Wird als Verfahrensprodukt die 2R-Indolincarbonensäure gewünscht, läßt sich das Verfahren in einer bevorzugten Ausführungsform unter Verwendung der Mikroorganismen DMF 3/3, DMF 5/8 oder EE-210 durchführen. Auf diese Weise lassen sich R-Verbindungen der Formel II sowie S-Verbindungen der Formel III in optischen Ausbeuten von bis zu 98% gewinnen. Ebenfalls läßt sich für diese Zwecke die aus EE-210 isolierte Esterase verwenden.

Wird als Verfahrensprodukt die 2S-Indolincarbonensäure gewünscht, läßt sich das Verfahren in einer besonders bevorzugten Ausführungsform unter Verwendung der aus dem Mikroorganismus DMF 5/8 isolierbaren Esterase durchführen. Auf diese Weise lassen sich S-Verbindungen der Formel II sowie R-Verbindungen der Formel III in optischen Ausbeuten von 90–92% gewinnen.

Die nachstehenden Beispiele dienen zur Illustrierung der Erfindung, ohne diese in irgendeiner Form wie etwa auf den Umfang der Beispiele, beschränken zu sollen. Mit "ee" gekennzeichnete Angaben sind optische Ausbeuten.

Beispiel 1

Isolierung von EE-210 (Syntrophe Mischkultur)

0,5 ml Abwasser aus der Ciba-Geigy Monthey werden in 50 ml Schüttelkolben mit 20 ml Medium MV7 überimpft, mit 5 g/l Methanol als Kohlenstoff-Quelle supplementiert und 7 Tage bei 28°C und 250 Upm inkubiert. 0,5 ml dieser ersten Anreicherungskultur werden in die gleiche Nährlösung überimpft und wieder 7 Tage bei 28°C und 250 Upm inkubiert. 0,5 ml der zweiten Anreicherungskultur werden wieder in das gleiche Medium überimpft und 7 Tage bei 28°C und 250 Upm inkubiert. Die zweite und dritte Anreicherungskultur werden auf MV7-Agar plattiert, mit 5 g/l Methanol supplementiert und bei 28°C inkubiert. Einzelkolonien werden gepickt und mehrmals auf dem gleichen Medium ausgestrichen. Die so isolierten EE-210-Kolonien werden auf MV7-Schrägagar aufbewahrt.

Das Medium MV7 (flüssig) setzt sich wie folgt zusammen:

2 g	NH ₄ NO ₃ (Stickstoffquelle)
1,4 g	Na ₂ HPO ₄ Puffer und Phosphor-Quelle
0,6 g	KH ₂ PO ₄ Puffer und Phosphor-Quelle
0,2 g	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
0,01 g	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
0,001 g	FeSO ₄ · 7 H ₂ O
1 ml	Spurenelementlösung (je 20 mg/l Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O, Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O, ZnSO ₄ · 7 H ₂ O, MnSO ₄ · H ₂ O, CuSO ₄ · 5 H ₂ O),

ad 1 Liter mit destilliertem Wasser, pH 7 mit NaOH, autoklavieren. Die Kohlenstoff-Quelle (Methanol, Methylamin etc.) wird sterilfiltriert und dem sterilen Medium bei Raumtemperatur zugesetzt.

Zusammensetzung des MV7-Agar

Wie Medium MV7 aber mit Zusatz von 20 g/l Agar (Difco). Die Kohlenstoff-Quelle wird vor dem Gießen bei 50–55°C zugegeben.

Herstellung der Vorkultur

Eine Probe des auf Schrägagar aufbewahrten EE-210 wird in einen 50 ml Schüttelkolben zu 20 ml Medium MV7 mit 5 g/l Ethanol gegeben und 72 Stunden bei 28°C und 250 Upm inkubiert. 2 ml dieser ersten Vorkultur werden in einen zweiten Schüttelkolben (500 ml) mit 100 ml Nährlösung MV7, 5 g/l Ethanol und 5 mmol Phosphatpuffer pH 7 gegeben und 72 Stunden bei 28°C und 250 Upm inkubiert.

Züchtung im 10 l-Maßstab

In einem Laborfermenter werden 10 l hitzesterilisierte (20 min, 120°C) Nährlösung MV7 und 50 g sterilfiltriertes Ethanol vorgelegt. Eine Probe mit circa 100 ml Vorkultur EE-210 wird zugegeben und unter folgenden Bedingungen fermentiert: pH 7 (mittels wäßriger 0,1 N NaOH konstant gehalten), 28°C, Luftzufuhr 0,25 l/min und Rührgeschwindigkeit von 400 Upm. Nach 48 Stunden werden weitere 50 g sterilfiltriertes Ethanol zugegeben. Nach 57 Stunden ist das eingesetzte Ethanol zu mehr als 95% abgebaut und die gebildete Zellmasse wird durch Zentrifugieren abgetrennt. Es resultieren 100 g Zellmaterial (Naßgewicht).

Beispiel 2

Isolierung von Esterase aus Ps. DMF 5/8

159 g Ps. DMF 5/8 Zellen werden mit 0,5 l Puffer A (0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,7, 0,1 M NaCl) gewaschen.

Aufschluß

Die gewaschenen Zellen (143 g) werden in 470 ml Puffer A suspendiert und in zwei Portionen während einer Stunde mit Ultraschall behandelt (Heat Systems-Ultrasonic Inc. Sonicator-W-375, volle Leistung = ca. 375 Watt, Rosette mit Eiswasser gekühlt). Anschließend werden die unlöslichen Zellbestandteile bei 20 000 Upm (20 min) abzentrifugiert (Sorvall Zentrifuge, Rotor SS-34). Der Überstand (Rohextrakt) enthält die Esterase.

Ionenaustauscher-Chromatographie

60 ml DEAE-Sephacel (Pharmacia) werden in Puffer A (1 l) äquilibriert und zum Rohextrakt (555 ml) gegeben. Nach vorsichtigem Einengen auf einer Nutsche wird das Säulenmaterial in eine Glassäule (1,6 × 30 cm) gefüllt und über Nacht mit Puffer A gespült (Fluß: 10 ml/h). Die Elution der Esterase erfolgt mit einem NaCl-Gradienten (0,1 M–1,0 M, 400 ml). Das Eluat wird in Fraktionen mit einer Kollektionsdauer von 20 Minuten (3,3 ml) aufgefangen. Die Esterase wird mittels DC in den Fraktionen 18–33 nachgewiesen. Diese Fraktionen werden gepoolt (54 ml) und im Diaflo (Membran YM-10) auf 12 ml eingengt.

Der Esterase-Pool aus dem vorhergehenden Reinigungsschritt wird über eine Sephacryl S-200 sf Säule (2,6 x 90 cm) gelfiltriert (Fluß: 10 ml/h; Phosphatpuffer, pH 7). Die Esterase wird mittels DC in den Fraktionen 90–98 nachgewiesen (Fraktionsvolumen: 3,3 ml). Diese Fraktionen werden gepoolt und lyophilisiert. Erhaltenes Lyophilisat: 346 mg, davon 31 mg Protein.

Charakterisierung der Esterase aus DMF 5/8

Molekulargewicht (Gelfiltration): 30 000 (\pm 5000)
 Stabilität ($T_{50\%}$): 45°C

Inhibitoren:

EDTA (10 mM): —
 Iodacetat (1 mM): —

Substrate:

N-Acetyl-2-indolincarbonsäure-methylester: +
 N-Acetyl-2-indolincarbonsäure-ethylester: +
 2-Indolincarbonsäuremethylester: —
 2-Indolcarbonylmethylester: —

Beispiel 3

Isolierung von Esterase aus der Mischkultur EE-210

500 g Zellmaterial (Naßgewicht) werden mit 1 l Puffer B (10 mM Phosphatpuffer, pH 7,5) gewaschen und anschließend in 1,5 l Puffer B über Nacht unter Rühren suspendiert.

Aufschluß

Die Suspension wird in 4 Portionen während je einer Stunde mit Ultraschall behandelt (Heat Systems-Ultrasonic Inc Sonicator-W-375, volle Leistung = ca. 375 Watt, Rosette mit Eiswasser gekühlt). Unlösliche Zellbestandteile werden durch Zentrifugieren bei 20 000 Upm (20 min) entfernt (Sorvall Zentrifuge, Rotor SS-34). Die Esterase befindet sich im Überstand (Rohextrakt).

Säurefällung

Der Rohextrakt wird durch Zugabe von Salzsäure unter ständigem Rühren bei 4°C langsam auf pH 4,3 gebracht. Der entstandene Niederschlag, der die Esterase enthält, wird bei 20 000 Upm (30 min) in einer Sorvall Zentrifuge (Rotor SS-34) abzentrifugiert. Das Zentrifugat wird in Puffer B aufgenommen und mit 1 N NaOH langsam auf pH 7,5 gestellt (Endvolumen: 675 ml).

Ionenaustauscher-Chromatographie

60 ml DEAE-Sephacel werden mit 1 l Puffer B äquilibriert und zur Enzymlösung aus dem vorherigen Reinigungsschritt gegeben. Das beladene Gelmaterial wird in eine Glassäule (2,5 x 25 cm) gegeben, über Nacht mit Puffer B gespült (10 ml/h) und anschließend mit einem NaCl-Gradienten (0–0,8 M, 400 ml) eluiert. Das Eluat wird in Fraktionen von 3,3 ml gesammelt. Die gesuchte Aktivität befindet sich in den Fraktionen 47–55. Diese werden gepoolt und im Diaflo eingeeengt (Membran YM-10).

Die Enzymlösung aus dem Diaflo (7,2 ml) wird über eine Sephadex G-75 Säule (2,6 x 90 cm) gelfiltriert (69 mM Phosphatpuffer, pH 7, 10 ml/h). Die Esterase wird mittels DC in den Fraktionen 59–69 (Fraktionsvolumen: 3,3 ml) nachgewiesen. Diese werden gepoolt und lyophilisiert. Erhaltenes Lyophilisat: 365 mg, davon 38,3 mg Protein.

Reinigung (Ausgangsmaterial: 500 g Zellen)

	Rohextrakt	gereinigte Esterase
Aktivität U (μ Mol/min)	18,4	2,8
Protein (mg)	9840	38
Spezifische Aktivität (U/mg)	0,002	0,013
Reinigungsfaktor	1	37
Ausbeute an Aktivität	100	15

Beispiel 4

Hydrolyse mit Mischkultur EE-210

In einem 500 ml Rundkolben werden 50 g tiefgefrorene EE-210-Zellen (Naßgewicht) in 100 ml 0,08 M Phosphatpuffer (pH 6) suspendiert und bei Raumtemperatur mit einer Lösung von 1,0 g (4,6 mmol) racemischem N-Acetyl-2-indolincarbonylmethylester in 100 ml 0,08 M Phosphatpuffer (pH 6)/Dimethylformamid (10 : 1) versetzt. Der Reaktionsablauf wird mittels HPLC kontrolliert (Säule Kontron-Lichrosorb RP18 10 μ m, 25 cm/0,5 cm, Laufmittel $H_2O/CH_3CN/H_3PO_4$ (750 g/250 g/2 g), 1,5 ml/min, UV-Detektor, 230 nm). Nach 96 Stunden Rühren bei Raumtemperatur mittels Magnetprüher beträgt der Umsatz 50%. Das Reaktionsgemisch wird mit 2 N H_2SO_4 auf pH 3 eingestellt und dreimal mit je 100 ml Ether extrahiert. Um eine bessere Trennung der Phasen voneinander zu erreichen, wird während 15 min bei 10 000 Upm zentrifugiert. Die Etherphasen werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vakuum eingeeengt. Man erhält 900 mg Rohprodukt. Dickschichtchromatographie einer Probe von 200 mg an 2 mm Kieselgel 60F Fertigplatten (Merck) mit $nBuOH/CH_3COOH/H_2O$ (4 : 1 : 1) liefert 90 mg reinen (gemäß HPLC) N-Acetyl-2S-indolincarbonylmethylester; $[\alpha]_{D^{20}} = -528^\circ$; ($c = 1$ in Ethanol); ee = 98%.

Beispiel 5

Hydrolyse mit ganzen Zellen Ps. DMF 3/3

In einem 250 ml-Kolben werden 10 g tiefgefrorene Ps. DMF 3/3-Zellen (Naßgewicht) in 90 ml Medium MV7 suspendiert und bei 37°C thermostatisiert. Anschließend wird eine Lösung von 400 mg (1,8 mmol) racemischem N-Acetyl-2-indolincarbonylmethylester in 8 ml Aceton zugetropft, und das Gemisch wird bei 37°C mittels Magnetprüher gerührt. Der pH-Wert wird mittels pH-Stat (Metrohm 655) mit 0,1 N NaOH konstant auf 7 gehalten. Nach 8 Stunden beträgt der Umsatz ca. 50% und die Reaktion wird durch Zugabe von 10 ml 3 N HCl gestoppt. Die Zellen werden abzentrifugiert (10 000 Upm, 20 min) und die saure wäßrige Phase

(pH 1) wird dreimal mit je 100 ml Ether extrahiert. Die Etherphasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Rohproduktgemisch (350 mg) wird auf einer Fertigsäule LiChroprep Si 60 Merck 10 410 getrennt. Der nicht umgesetzte N-Acetyl-2S-indolincarbonsäuremethylester (201 mg, Fp. 125°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -12^\circ$, $c = 0,3$ in CHCl_3) wird mit reinem Ether eluiert. Die N-Acetyl-2R-indolincarbonsäure (110 mg, Fp. 202–206°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +408^\circ$, $c = 0,3$ in Ethanol, $ee = 77\%$) wird anschließend mit Essigester/Essigsäure (95 : 5) eluiert.

Beispiel 6

Hydrolyse mit Esterase aus Ps. DMF 5/8

In einem 100 ml Rundkolben wird 1 ml einer wäßrigen Lösung von Esterase aus Ps. DMF 5/8 (5 mg/ml) mit 0,08 M Phosphatpuffer (pH 6) auf 20 ml verdünnt. Eine Lösung von 132 mg (0,6 mmol) racemischem N-Acetyl-2-indolincarbonsäuremethylester in 2 ml Aceton und 0,5 ml 0,08 M Phosphatpuffer (pH 6) wird dann langsam unter Rühren zugetropft. Nach 20 Stunden Rühren mittels Magnetprüher bei Raumtemperatur wird mit 10%iger, NaHCO_3 -Lösung der pH-Wert auf ca. 9 eingestellt und anschließend dreimal mit je 50 ml extrahiert. Die Etherphasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Es werden 120 mg nicht umgesetzter N-Acetyl-2R-indolin-carbonsäuremethylester isoliert (Rohausbeute). Die wäßrige Phase wird mit 6 N HCl angesäuert und zweimal mit je 100 ml Ether extrahiert. Die Etherextrakte werden über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Umkristallisieren des Rohproduktes in Dichlormethan/Hexan liefert 12 mg N-Acetyl-2S-indolincarbonsäure (Fp 205°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -522^\circ$, $c = 0,2$ in Ethanol, $ee 92\%$).